

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

AA

(11)Publication number : 2002-262883

(43)Date of publication of application : 17.09.2002

(51)Int.CI.

C12N 15/09
 C07K 1/113
 C12N 1/15
 C12N 1/19
 C12N 1/21
 C12N 5/10
 C12P 21/08
 // C12N 9/90
 (C12P 21/08
 C12R 1:01)

(21)Application number : 2001-070928

(71)Applicant : SEKISUI CHEM CO LTD
MARINE BIOTECHNOL INST CO LTD

(22)Date of filing :

13.03.2001

(72)Inventor : IDENO AKIRA
MARUYAMA TADASHI
FURUYA MASAHIRO**(54) METHOD FOR PRODUCING MONOCLONAL ANTIBODY****(57)Abstract:**

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a low cost, efficient and in vitro method for producing a monoclonal antibody having a high specificity and high affinity.

SOLUTION: This method for producing the monoclonal antibody is provided by (a) co-expressing an antibody gene with a gene encoding a PPIase having a chaperone-like activity in a transformed body, and producing the monoclonal antibody as a soluble fraction, or (b) solubilizing the monoclonal antibody expressed as an inclusion body with a modifying agent, and further folding it in the presence of the PPIase having the chaperone-like activity.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-262883

(P2002-262883A)

(43)公開日 平成14年9月17日(2002.9.17)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード(参考)
C 12 N 15/09	ZNA	C 07 K 1/113	4 B 0 2 4
C 07 K 1/113		C 12 N 1/15	4 B 0 5 0
C 12 N 1/15		1/19	4 B 0 6 4
1/19		1/21	4 B 0 6 5
1/21		C 12 P 21/08	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 請求項の数11 O.L (全16頁) 最終頁に統く

(21)出願番号 特願2001-70928(P2001-70928)

(71)出願人 000002174

積水化学工業株式会社

大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号

(22)出願日 平成13年3月13日(2001.3.13)

(71)出願人 591001949

株式会社海洋バイオテクノロジー研究所

東京都文京区本郷1丁目28番10号

(72)発明者 井手野 晃

岩手県釜石市平田第3地割75番1 株式会
社バイオテクノロジー研究所釜石研究所内

(74)代理人 100106596

弁理士 河備 健二

最終頁に統く

(54)【発明の名称】 モノクローナル抗体の製造方法

(57)【要約】

【課題】 安価で、効率的な、イン・ビトロでの高特異性、高親和性モノクローナル抗体の製造方法の提供。

【解決手段】 (a) 抗体遺伝子とシャベロン様活性を有するPPIaseをコードする遺伝子とを形質転換体内で共発現させ、モノクローナル抗体を可溶画分として産生させること、又は、(b) 封入体として発現させたモノクローナル抗体を、変性剤によって可溶化させ、さらにシャベロン様活性を有するPPIaseの共存下でフォールディングさせることにより提供。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 抗体遺伝子とシャベロン様活性を有するPPaseをコードする遺伝子とを含む形質転換体。

【請求項2】 請求項1に記載の形質転換体を培養して、抗体遺伝子とシャベロン様活性を有するPPaseをコードする遺伝子とを形質転換体内で共発現させ、モノクローナル抗体を可溶画分として産生させることを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項3】 シャベロン様活性を有するPPaseをコードする遺伝子が、古細菌由来FKBPタイプPPase遺伝子、バクテリア由来トリガーファクタータイプPPase遺伝子、及び真核生物由来FKBP52タイプPPase遺伝子からなる群から選ばれた少なくとも1種であることを特徴とする請求項1又は2に記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項4】 古細菌由来FKBPタイプPPase遺伝子が、16~18kDaの古細菌由来FKBPタイプPPaseをコードする遺伝子であることを特徴とする請求項3に記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項5】 抗体遺伝子が、Fab遺伝子であることを特徴とする請求項1~4のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項6】 Fab遺伝子が、マウスIgG由来Fab遺伝子であることを特徴とする請求項5に記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項7】 インクルージョンボディとして発現させたモノクローナル抗体を、変性剤によって可溶化させ、さらにシャベロン様活性を有するPPaseの共存下でフォールディングさせることを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項8】 シャベロン様活性を有するPPaseが、古細菌由来FKBPタイプPPase、バクテリア由来トリガーファクタータイプPPase、及び真核生物由来FKBP52タイプPPaseからなる群から選ばれた少なくとも1種であることを特徴とする請求項7に記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項9】 古細菌由来FKBPタイプPPaseが、16~18kDaの古細菌由来FKBPタイプPPaseであることを特徴とする請求項8に記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項10】 モノクローナル抗体が、Fabであることを特徴とする請求項7~9のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項11】 Fabが、マウスIgG由来のFabであることを特徴とする請求項10に記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、イン・ビトロでのモノクローナル抗体の製造方法に関し、さらに詳しく

は、シャベロン様活性を有するPPaseの機能を利用した、安価で、高効率な、イン・ビトロでの高特異性、高親和性モノクローナル抗体の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 抗体は、分子量が10万Daを越える巨大分子であり、特定の抗原物質に特異的に結合する機能が利用され、分析用試薬、生体外診断薬等として幅広く使用されている。抗体分子において、抗原物質との結合に寄与している部分は、V領域（可変領域）と呼ばれ、H鎖のV領域とL鎖のV領域とから構成されている。特定抗原に対する抗体を取得する方法としては、ラットやウサギ等の実験動物に抗原物質を免疫感作させ、その血清に含まれる抗体（ポリクローナル抗体）を得る方法と、次に述べるモノクローナル抗体を得る方法が一般的である。

【0003】 モノクローナル抗体は、単一クローニングの抗体産生細胞が产生する抗体であり、その特徴は一次構造が均一なことである。モノクローナル抗体は、ケーラーとミルシュタインによるハイブリドーマ技術の確立によって容易に製造できるようになった。この方法では、まず、所定の抗原物質をマウス等の実験動物に投与して免疫感作を行う。次に、免疫感作された動物の脾臓から、該抗原物質に対する抗体産生能を獲得した脾臓細胞を取り出し、これをミエローマのような適切な腫瘍細胞と融合させてハイブリドーマを作製する。次いで、ELISA等の適当な免疫分析法を用いたスクリーニングにより、目的の抗体物質を産生しているハイブリドーマを選択する。その後、限界希釈法等を用いてクローニングすることにより、目的のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ株を樹立する。こうして樹立されたハイブリドーマを適当な培地で培養した後、その代謝産物を含む培地をクロマトグラフ等を用いて分離することにより、目的のモノクローナル抗体が得られる。

【0004】 現在、ハイブリドーマ技術はモノクローナル抗体を取得するための方法として汎用されているが、この方法は、動物に対する免疫感作というイン・ビトロでの生体反応を利用していているため、必然的に実験動物の介在を必要とする。即ち、モノクローナル抗体を取得するためには、実験動物を飼育維持しなければならず、煩雑な労力を必要とするとともに、多大なコストが必要となる。また、この方法では、生体反応を利用してするために試行錯誤的な要素が含まれ、必ずしも全ての抗原物質に対するモノクローナル抗体が製造できるとは限らないという問題がある。

【0005】 一方、近年、遺伝子工学技術が飛躍的に進歩し、大腸菌の表面に、抗体のH鎖及びL鎖のV領域のみを適当なリンカーを介して連結させたscFv（single chain Fv）、抗体のFab部分等を発現することが可能となった。また、PCR法を用いて抗体遺伝子をランダムに増幅することで抗体遺伝子のラ

イブラーを作製、細胞外に提示させ、これらのライブラーから特定抗原に親和性を有するものをスクリーニングする方法が開発されつつある（熊谷ら、タンパク質・核酸・酵素、1998、43、159-167）。従って、このスクリーニング法によって得られた抗体遺伝子を、大腸菌等を用いて遺伝子工学的に発現できれば、実験動物を用いることなく目的の抗原に対する抗体を生産することが可能となる。

【0006】しかしながら、上記技術には、例えば、大腸菌を用いて抗体遺伝子を大量発現させる場合、抗体のほとんどが不溶性のインクルージョンボディ（封入体）として発現され、活性型を直接的に得ることはできないという問題がある。

【0007】このため、抗体遺伝子にシグナル配列を連結し、ペリプラズム領域に抗体を分泌発現させる方法も提案されているが、分泌量が極めて少ない（Pluckthun, Biotechnology, 1991, 9, 545）ため、実用的な方法とはいひ難い。ところで、FabはscFVと比べて構造が安定であるため機能性に優れているという利点を有するが、技術的な困難性が高いためか、scFVタイプの抗体の大腸菌細胞内での発現に関する報告（Wirts et al., (2000) Protein Sci. 8, 2245）はあるものの、Fabタイプの抗体の発現に関する報告は未だない。

【0008】また、活性型の抗体を効率的に生産するために、タンパク質の立体構造形成や構造変化に関与する因子を、抗体のリフォールディングを利用してすることも検討されており、例えば、特開平9-220092号公報には、封入体として発現された抗体を、塩酸グアニジン等で可溶化し、シャベロニンを用いてリフォールディングさせる方法や、抗体遺伝子をシャベロニン遺伝子と大腸菌内で共発現させる方法が開示されている。しかしながら、シャベロニンをタンパク質生産に応用する場合には、ATP、CTP、UDPといった高エネルギー物質を共存させる必要があり、また、シャベロニンは、目的タンパク質と1:1のモル比率で作用するため、分子量が100万Daに近い高分子量のシャベロニンを目的タンパク質に対して非常に高濃度で用いる必要もあり、利便性に欠け、経済性にも欠けるという問題がある。

【0009】なお、シャベロニンは、熱ショックタンパク質の一群であり、細胞が温度変化等の様々な環境ストレスにさらされた際に產生されるが、これらは、原核生物、真核生物を問わず広く存在しており、特に、大腸菌から產生される分子シャベロンとしてのGroEが良く知られている。また、このGroEは、タンパク質の種類を選ばず、非特異的にタンパク質の立体構造形成に関与することも明らかにされている。例えば、上記GroEの構成体であるGroELは、7個のサブユニットが環状に連なったドーナツ型構造が2段に重なった、合計

14サブユニットからなる特徴的な構造を有しているが、このドーナツ構造の凹部に変性タンパク質を捕捉し、ATP等のヌクレオチドの消費と、補助因子であるGroESの結合によって、変性タンパク質を正しい立体構造のタンパク質へと効率的に折り畳むことが知られている。

【0010】さらに、特開平11-285398号公報には、メタノコッカス属細菌から調製したPPase (Peptidyl prolyl cis-trans isomerase) を変性タンパク質のリフォールディングに利用することが開示されているが、高い特異性、親和性を要求される抗体のリフォールディングへの適用は検討されておらず、また、変性タンパク質のリフォールディング効率の点からも十分満足できるものではなかった。なお、PPaseは、後述のように、ポリペプチド鎖中のプロリン残基のN末端側ペプチド結合の回転を促し、タンパク質高次構造の再生速度を促進させる機能(PPase活性)を有する酵素である。

【0011】上記のとおり、実験動物を用いることなく、目的の抗原に対する抗体を遺伝子工学的に生産するための方法が種々検討されているが、発現-フォールディング効率の点からは十分満足できるものではなく、高い特異性、親和性を有するモノクローナル抗体を遺伝子工学的に生産する方法のさらなる効率向上が望まれていた。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、上記の従来技術の問題点に鑑み、安価で、高効率な、イン・ビトロでの高特異性、高親和性モノクローナル抗体の製造方法を提供することにある。

【0013】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を達成すべく鋭意研究した結果、(a)抗体遺伝子とシャベロニン様活性を有するPPaseをコードする遺伝子とを形質転換体内で共発現させ、モノクローナル抗体を可溶画分として产生させること、又は、(b)インクルージョンボディとして発現させたモノクローナル抗体を、変性剤によって可溶化させ、さらにシャベロニン様活性を有するPPaseの共存下でフォールディングさせることにより、上記課題が達成されることを見出し、斯かる知見に基づいて本発明を完成するに至った。

【0014】即ち、本発明の第1の発明によれば、抗体遺伝子とシャベロニン様活性を有するPPaseをコードする遺伝子とを含む形質転換体が提供される。

【0015】また、本発明の第2の発明によれば、第1の発明の形質転換体を培養して、抗体遺伝子とシャベロニン様活性を有するPPaseをコードする遺伝子とを形質転換体内で共発現させ、モノクローナル抗体を可溶画分として产生させることを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法が提供される。

【0016】また、本発明の第3の発明によれば、第1又は第2の発明において、シャベロン様活性を有するPPaseをコードする遺伝子が、古細菌由来FKBPタイプPPase遺伝子、バクテリア由来トリガーファクタータイプPPase遺伝子、及び真核生物由来FKBP52タイプPPase遺伝子からなる群から選ばれた少なくとも1種であることを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法が提供される。

【0017】また、本発明の第4の発明によれば、第3の発明において、古細菌由来FKBPタイプPPase遺伝子が、16~18kDaの古細菌由来FKBPタイプPPaseをコードする遺伝子であることを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法が提供される。

【0018】また、本発明の第5の発明によれば、第1~第4のいずれかの発明において、抗体遺伝子が、Fab遺伝子であることを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法が提供される。

【0019】さらに、本発明の第6の発明によれば、第5の発明において、Fab遺伝子が、マウスIgG由来Fab遺伝子であることを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法が提供される。

【0020】一方、本発明の第7の発明によれば、インクルージョンボディとして発現させたモノクローナル抗体を、変性剤によって可溶化させ、さらにシャベロン様活性を有するPPaseの共存下でフォールディングさせることを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法が提供される。

【0021】また、本発明の第8の発明によれば、第7の発明において、シャベロン様活性を有するPPaseが、古細菌由来FKBPタイプPPase、バクテリア由来トリガーファクタータイプPPase、及び真核生物由来FKBP52タイプPPaseからなる群から選ばれた少なくとも1種であることを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法が提供される。

【0022】また、本発明の第9の発明によれば、第8の発明において、古細菌由来FKBPタイプPPaseが、16~18kDaの古細菌由来FKBPタイプPPaseであることを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法が提供される。

【0023】また、本発明の第10の発明によれば、第7~第9のいずれかの発明において、モノクローナル抗体が、Fabであることを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法が提供される。

【0024】さらに、本発明の第11の発明によれば、第7~第9のいずれかの発明において、モノクローナル抗体が、マウスIgG由来のFabであることを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法が提供される。

【0025】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。

【0026】1. PPase (Peptidyl prolyl cis-trans isomerase)

prolyl cis-trans isomerase

本発明で用いられるPPase (Peptidyl prolyl cis-trans isomerase) は、シャベロン様活性を有する、古細菌由来のFKBPタイプPPase、バクテリア由来トリガーファクタータイプPPase、及び真核生物由来52kDa FKBPタイプPPaseからなる群から選ばれた少なくとも1種のPPaseである。

【0027】PPaseは、免疫抑制剤として知られるサイクロスボリンやFK506のターゲット分子であり、これらの免疫抑制剤に対する感受性から、シクロフィリンタイプとFKBP (FK506 binding protein) タイプとに大別される。

【0028】また、PPaseは、ポリペプチド鎖中のプロリン残基のN末端側ペプチド結合のシストラヌス異性化反応を触媒することにより、タンパク質高次構造の再生速度を高める機能 (PPase活性) を有することから、前記シャベロニンと同様に、タンパク質の安定化や変性タンパク質の再生に利用できるものとして期待されていた。

【0029】興味深いことに、古細菌由来のFKBPタイプPPaseは、上記PPase活性だけでなく、本来シャベロニンの機能とされていた、タンパク質巻き戻りの収量そのものを増大させる活性やタンパク質の不可逆的凝集を抑制する活性 (シャベロン様活性) を有し (Maruyama et al., 2000, Front Biosci. 2000 Sep 1, 5, D821-836)、また、このシャベロン様活性は、バクテリア由来のトリガーファクタータイプPPase (Huang, G.-C., et al. (2000) Protein Sci. 9, 1254-1261)、真核生物由来FKBP52タイプPPase (Bose, S., et al. (1996) Science 274, 1715-1717) にも見られる機能である。

【0030】また、PPaseは、シャベロニンとは異なり、タンパク質生産への応用において、ATP等といった高エネルギー物質を必要とせず、分子量が小さいため、安価で、かつ取り扱い上の利便性も高く、さらに、発現-フォールディングの効率も高いという特徴を有する。

【0031】ここで、上記のシャベロン様活性は、ロダネーゼやクエン酸合成酵素、リンゴ酸脱水素酵素、グルコース-6-リン酸脱水素酵素等をモデル酵素とし (河田1998, バイオサイエンスとインダストリー56, 593-598)、これらを6M塩酸グアニジン等のタンパク質変性剤で変性処理後、PPaseやシャベロニンを含む緩衝液で変性剤を希釈した際に開始する変性タンパク質の再生率や、変性タンパク質の凝集の抑制率で評価することができる。変性タンパク質の再生率を評

価する方法としては、例えば、ホロビッチらの方法が (Horowitz, 1995, Methods Mol. Biol. 40, 361-368)、変性タンパク質の凝集抑制を評価する方法としては、田口らの方法 (Taguchi et al. 1994, J. Biol. Chem. 269, 8529-8534) 等がそれぞれ挙げられる。

【0032】なお、上記の免疫抑制剤に非感受性でアミノ酸配列のホモロジーも異なるバープリン (Parvulin) タイプが近年見つかってきており、また、バクテリア由来のトリガーファクターはFKBPと相同性の高い領域を持つため、FKBPタイプPPaseのサブクラスと位置づけられている。

【0033】本発明で用いられる古細菌由来のFKBPタイプPPaseとしては、例えば、アシディアヌス (Acidianus) 属、メタロスphaera (Metallocphaera) 属、スティジオロバス (Stygiolobus) 属、スルフォロバス (Sulfolobus) 属、スルフロコッカス (Sulfurooccus) 属及びスルフリスphaera (Sulfurisphaera) 属等のスルフォロバレス (Sulfolobales) 目、エロバイラム (Aeropyrum) 属、デスルフロコッカス (Desulfurococcus) 属、ステッテリア (Stetteria) 属、スタフィロサーマス (Staphylothermus) 属、サーモディスカス (Thermodiscus) 属、イグネオコッカス (Ignneococcus) 属、サーモスphaera (Thermosphaera) 属、スルフォフォボコッカス (Sulfophobococcus) 属、ハイバーサーマス (Hyperthermus) 属、バイロディクティウム (Pyrodictium) 属、及びバイロロバス (Pyrolobus) 属等のイグネオコッカレス (Ignneococcules) 目、バイロバキュラム (Pyrobaculum) 属、サーモプロテウス (Thermoproteus) 属、サーモフィラム (Thermofilum) 属、及びカルドコッカス (Caldococcus) 属等のサーモプロテアレス (Thermoproteales) 目、アキオグロバス (Archaeoglobus) 属、及びフェログロバス (Ferroglobulus) 属等のアキオグロバレス (Archaeoglobales) 目、メタノサーマス (Methanothermus) 属、メタノバクテリウム (Methanobacterium) 属、メタノサーモバクター (Methanothermobacter) 属、及びメタノスphaera (Methanospaera) 属等のメタノバクテリアレス (Methanobacteriales) 目、メタノコッカス (Methanococcus) 属、メタノサーモコッカス (Methanothermococcus) 属、メタノカルドコッカス (M-

ethanocaldocalcoccus) 属、及びメタノイグニス (Methanoignis) 属等のメタノコッカレス (Methanococcales) 目、メタノミクロバイアレス (Methanomicrobiales) 目、メタノザルチナ (Methanosarcina) 属等のメタノザルチナレス (Methanosarcinales) 目、メタノバイラレス (Methanopyrales) 目、バイロコッカス (Pyrococcus) 属、及びサーモコッカス (Thermococcus) 属等のサーモコッカレス (Thermococcales) 目、サーモプラズマ (Thermoplasma) 属、及びピクロフィラス (Picropilius) 属等のサーモプラスマレス (Thermoplaesmales) 目、ハロバクテリウム (Halobacterium) 属、ハロコッカス (Halococcus) 属、ナトゥノバクテリウム (Natronobacterium) 属、ナトゥノコッカス (Natronococcus) 属、ハロアーキュラ (Halorcula) 属、ハロフェラックス (Haloferox) 属、ハロバキュラム (Halobaculum) 属、ハロルブラム (Halorubrum) 属、ナトウリアルバ (Natrialba) 属、ナトウロノモナス (Natronomonas) 属、ハロジエオメトリカム (Halogeometricum) 属、及びハロテリジエナ (Haloterrigena) 属等のハロバクテリアレス (Halobacteriales) 目等由来のPPaseが挙げられる。

【0034】本発明においては、これら古細菌由来のPPaseの中でも、好熱性又は超好熱性古細菌由来のPPaseを使用することが好ましく、とりわけメタノコッカス属、サーモコッカス属、バイロコッカス属、サーモプラズマ属、メタノバクテリウム属由来のPPaseを使用することが好ましい。

【0035】また、古細菌由来のFKBPタイプのPPaseは、分子量が17-18 kDa程度の短いタイプのものと、分子量が26-33 kDa程度の長いタイプのものとに分類される (Maruyama, T and Furutani, MFront Biosci. 2000 Sep 1, 5, D821-836; Iida et al., 2000, Gene 256, 319-326)。本発明においては、いずれの分子量のPPaseを用いてもよいが、発現-リフォールディング効率の観点から、17-18 kDa程度の短いものを用いることが好ましい。古細菌由来PPaseの一例として、メタノコッカス・ヤナシイ由来の18 kDa FKBPタイプPPaseのアミノ酸配列と遺伝子配列を、配列番号1、2にそれぞれ示す。

【0036】トリガーファクタータイプPPaseは、ヒト由来12 kDa FKBPタイプPPaseと相同性の高い領域を有し、そのN末端とC末端に、そ

それ約140アミノ酸と約200アミノ酸からなるドメインを形成するタンパク質である(Zarnt, et al. (1997) J. Mol. Biol. 271, 827-837)。これらは、タンパク質新生の初期段階においてリボゾームと相互作用し、タンパク質のフォールディングに関与していると言われている。本発明で用いられるトリガーファクタータイプPPIaseとしては、大腸菌やバチラス、サーモトガ、マイコバクテリウム、マイコプラズマ等、バクテリア由来のものが挙げられる。バクテリア由来PPIaseの一例として、大腸菌由来のトリガーファクタータイプPPIaseのアミノ酸配列と遺伝子配列を、配列番号3、4にそれぞれ示す。

【0037】真核生物由来のFKBPタイプPPIaseは、分子量が約52kDaであり、p59又はHSP56等と呼ばれる。そのアミノ酸配列は、ヒト由来12kDa FKBPタイプPPIaseと相同性の高い領域2つがタンデムに連なり、さらに、そのC末端側にカルモジュリン結合部位を含む領域が連なった構造を有する(Ratajczak, T., et al. 1993, J. Biol. Chem. 268, 13187-13192)。また、これらは、PPIase活性だけでなく、シャベロン様活性を持つことが報告されている(Bose, S., et al. (1996) Science 274, 1715-1717)。本発明においては、ヒト由来のものと相同性が高く、シャベロン様活性を示すものであれば、いずれのFKBP52タイプPPIaseを用いてもよい。真核生物由来FKBPタイプPPIaseの一例として、ヒト由来のFKBP52タイプPPIaseのアミノ酸配列と遺伝子配列を、配列番号5、6にそれぞれ示す。

【0038】本発明においては、上記PPIaseのいずれを用いてもよく、また2種以上を併用してもよいが、発現-リフォールディング効率の観点からは、古細菌由来の約16-18kDaのFKBPタイプPPIaseを用いることが好ましい。さらに、本発明においては、タンパク質のフォールディング効率を向上させるために、ジスルフィド結合の組替えを促進する機能を有するPDI(プロテインジスルフィドイソメラーゼ)を併用してもよい。

【0039】2. 抗体遺伝子とPPIase遺伝子との共発現

本発明においては、好ましい実施態様の一つとして、シャベロン様活性を有するPPIase遺伝子とともに抗体遺伝子を形質転換体内で共発現させ、抗体遺伝子の発現産物を可溶性画分に產生させる。

【0040】PPIase遺伝子とともに抗体遺伝子を共発現させる方法としては、PPIaseをコードする遺伝子を、例えば、pACYC系プラスミドの発現プロモーターの下流部に挿入し、宿主菌内に導入すればよ

い。抗体遺伝子がpET等のCoIE1系のDNA複製開始領域を持つ発現ベクターに挿入されている場合、pACYCベクターは同ベクターと宿主菌内で共存可能であるため、それぞれのプラスミドに別の薬剤耐性マーカーを所有させておけば、両遺伝子が導入された形質転換体を選別でき、また、両遺伝子はそれぞれのプロモーター制御下で発現が可能となる。逆に、目的タンパク質をpACYC系に、PPIase遺伝子をCoIE1系に組み込んでもよい。もちろん、PPIase遺伝子と抗体遺伝子を、一つの発現ベクター上に直列に挿入し、1つ又は2種以上のプロモーターで発現を制御してもよい。両遺伝子を含む形質転換体を適当な培地で培養し、両遺伝子の発現を誘導すれば、PPIaseのPPIase活性及びシャベロン様活性等の効果により、抗体のミスフォールディングが抑制されるとともに、抗体の封入体形成が妨げられ、可溶性画分に抗体が高効率に產生される。

【0041】3. 封入体のリフォールディング

本発明においては、好ましい他の実施態様の一つとして、大腸菌等の形質転換体によって封入体として発現させたモノクローナル抗体を変性剤によって可溶化し、シャベロン様活性を有するPPIaseの共存下でリフォールディングさせる。

【0042】封入体は、不溶性のため、菌体を超音波破碎し、その不溶性画分を精製することで得られ、尿素又は塩酸グアニジン等を用いて可溶化することができる。可溶化した抗体をリフォールディングするには、可溶化した目的の抗体を上記のPPIaseと共にさせればよい。具体的には、封入体として発現した抗体を、あらかじめ8M尿素や6M塩酸グアニジンで可溶化しておき、PPIaseを含む緩衝液で30-200倍に希釈すればよい。必要に応じて、緩衝液にはDTT等の様な還元剤やEDTA等のようなキレート剤等を加えておいてもよい。抗体とPPIaseの混合比率は、モル比で、抗体1に対して、通常0.01-100、好ましくは0.1-30である。

【0043】4. 抗体

本発明の製造方法が適用可能な抗体としては、いずれの動物種由来の抗体であっても、いずれのサブクラスの抗体であってもよく、また、抗体全長であっても、Fab、scFV等であってもよい。本発明の製造方法は、Fabの产生、特に、マウス由来IgGからのFabの产生に好適に用いることができる。

【0044】

【実施例】以下、本発明の製造方法をさらに詳細に説明するために、実施例を挙げて具体的に説明するが、本発明は、これらの実施例によって限定されるものではない。

【0045】【実施例1】サーモコッカスsp. KS-1由来FKBPタイプPPIaseのシャベロン様活性

*Thermoplasma acidophilum*由来クエン酸合成酵素（以後CSという；Sigma社）を6M塩酸グアニジン及び5mM DTTを含む25mMリノ酸ナトリウム（pH7.0）中に溶解し、50°Cで30分変性させた。この変性CS 1に対し、特開平11-318464号公報記載のサーモコッカスsp. KS-1由来FKBPタイプPPase（以後TcFK 1.5-30倍量を含む25mMリノ酸ナトリウム（pH7.0）で40倍に希釈することによりフォールディングを開始させた。反応は50°Cで50分間（図1-1）、及び、30°Cで90分間（図1-2）行った。反応中のCSの最終濃度は0.33μMとした。CSの活性は文献[Srere, P. A., et al., (1963) Acta Chem. Scand. 17, S129-S134; Furutani, M., et al., (1998) J. Biol. Chem. 273, 28399-28407]に従って測定し、ネイティブ型CSの活性を100%として相対評価した。50°Cの実験に関しては、TcFKの代わりにRNase T1を、30°Cの実験ではBSA及びヒト12kDa FKBPタイプPPaseをそれぞれ比較例として用いた。図1-1に示すとおり、TcFKは変性したCSのフォールディング収量を上げるシャペロン様活性を示した。比較例として用いたRNase T1にはシャペロン様活性は見られなかった。また、図1-2に示すように、30°CにおいてもTcFKはCSのフォールディング収量を向上させたのに対し、BSA及びヒト12kDa FKBPタイプPPaseにはシャペロン様活性は見られなかった。

【0046】〔実施例2〕サーモコッカスsp. KS-1由来FKBPタイプPPase及びその発現ユニットのクローニング

特開平11-318464号公報記載のサーモコッカスsp. KS-1由来FKBPタイプPPase（Tc*

TcFK遺伝子の増幅に用いたプライマー

名称	配列
TcFK-Fc2	5'-gggcattgcaattaatacgactcaactatagg-3'
TcFK-Rc1	5'-ccctctagaaagctaagctcttgatgc-3'

【0048】

【表2】

PCRの反応組成

Reaction buffer(x10)	10μl
DNTP	8μl
Ex Taq	0.5μl
pEFB1-3(10ng/μl)	2μl
TcFK-Fc2 (20pmol/μl)	4μl
TcFK-Rc1 (20pmol/μl)	4μl
滅菌水	71.5μl
合計	100μl

【0049】

【表3】

*FK）の発現用プラスミドpEFE1-3を鋳型とし、T7プロモーターを上流に含むTcFK遺伝子をPCR法によって増幅した。遺伝子増幅用のプライマーとして、TcFK-Fc2及びTcFK-Rc1をそれぞれ用いた（表1）。また、PCRの反応組成及び反応サイクルは、それぞれ表2及び表3に示すとおりである。DNAポリメラーゼは、TaKaRa社Ex. Taqを使用した。PCR法によって得られた増幅産物を、2%アガロースゲル電気泳動により分離後、DNA断片を含むバンド部分を切り出し、フェノール・クロロホルム処理及びエタノール沈殿により目的DNAの抽出を行った。DNA断片を滅菌水に溶解し、各約10～100ngに対して10倍量のpT7 blue Tプラスミドベクター（Novagen）を加え、さらに16°Cで1時間処理することによりDNA断片をライゲーションした。上記ライゲーション液をコンビテントセル大腸菌JM109株に加えることによりトランスクローメーションした。これら菌株の懸濁液を100μgml⁻¹アンビシリンナトリウム、100μM IPTG及び0.004%X-Galを含有するLB寒天培地に接種し、一晩37°Cで培養し、得られたホワイトコロニーについて、その菌株のプラスミドDNAを鋳型とするPCRを行い、DNA断片に対応するプライマーで増幅されるコロニーを陽性コロニーとした。陽性コロニーからpT7プラスミドDNAを回収した後、プラスミドを鋳型とし、BIG Dye (PERKIN-ELMER) を用いたシーケンス反応（プライマーはT7プロモータープライマー及びU-19リバースプライマー）を行うことにより、得られたPCR産物の塩基配列を決定した。この配列をサーモコッカスsp. KS-1のTcFK遺伝子の塩基配列、及びT7プロモータ領域のそれと比較した結果、その遺伝子の配列と相違ないことを確認した。

【0047】

【表1】

PCRの反応条件		
プレヒート	94°C × 5min	1cycle
変性	94°C × 0.5min	
アニーリング	58°C × 1min	30cycle
増幅	72°C × 1min	

【0050】〔実施例3〕サーモコッカスsp. KS-1由来FKBPタイプPPaseの発現系構築

PPase遺伝子及びT7プロモータ領域を含むpT7 blueプラスミドDNAについて制限酵素処理を行い、PPase遺伝子発現ユニットをコードするDNA断片の切り出しを行った。制限酵素はSph I及びBam H Iの組み合わせを用いた。切断した遺伝子断

13

片は2%アガロースゲルにより、分離・抽出した後、あらかじめ制限酵素処理したpACYC184プラスミドDNA（和光純薬）にライゲーションした。得られたライゲーション反応液を100μg/ml⁻¹クロラムフェニコールを含有するLB寒天培地に接種し、一晩37°Cにて培養し、得られたコロニーについて、その菌株のプラスミドDNAを錠型とするPCRを行い、DNA断片に対応するプライマーで増幅されるコロニーを陽性コロニーとした。PPIase遺伝子を含む陽性コロニーからpACYC184プラスミドDNAを回収した。

[0051] [実施例4] マウス由来抗-卵白リゾチム(HEL)Fab遺伝子のクローニング

Ibaらによって構築されたAnti-HEL-Fab発現用プラスミドpAALFabを錠型とし(Iba, Y., et al. 1997, Gene 194, 35-46)、H鎖及びL鎖をPCR法によって増幅した。遺伝子増幅用のプライマーとして、H鎖についてはHELVH-F1及びHELVH-R1を、L鎖についてはHELVL-F1及びHELVL-R1をそれぞれ用いた(表4)。また、PCRの反応組成及び反応サイクルは、それぞれ表5及び表6に示すおりである。DNAポリメラーゼは、Takara社Ex.Taqを使用した。PCR法によって得られた各々の増幅産物を、2%アガロースゲル電気泳動により分離後、DNA断片を含むバンド部分を切り出し、フェノール・クロロホルム處理及*

* びエタノール沈殿により目的DNAの抽出を行った。H鎖及びL鎖それぞれのDNA断片を滅菌水に溶解し、各約10~100ngに対して10倍量のpT7blueプラスミドベクター(Novagen)を加え、さらに16°Cにて1時間処理することによりそれぞれのDNA断片をライゲーションした。上記ライゲーション液をそれぞれのコンビテントセル大腸菌JM109株に加えることによりトランスフォーメーションした。これら菌株の懸濁液を100μg/ml⁻¹アンビシリントリウム、100μM IPTG及び0.004%X-Galを含有するLB寒天培地に接種し、一晩37°Cにて培養し、得られたホワイトコロニーについて、その菌株のプラスミドDNAを錠型とするPCRを行い、DNA断片に対応するプライマーで増幅されるコロニーを陽性コロニーとした。それぞれの陽性コロニーからpT7プラスミドDNAを回収した後、プラスミドを錠型とし、BIG Dye (PERKIN-ELMER)を用いたシーケンス反応(プライマーはT7プロモータープライマー及びU-19リバースプライマー)を行うことにより、得られたPCR産物の塩基配列を決定した。この配列をAnti-HEL-Fab H鎖、及びL鎖の遺伝子の塩基配列と比較した結果、それらの遺伝子の配列と相違ないことを確認した。

[0052]

[表4]

Anti-HEL-Fab遺伝子の増幅に用いたプライマー

名称	配列
HELVH-F1	5'-cccatatgcagggtgcagctgcggcaagatca-3'
HELVH-R1	5'-ggaaatgttgcactgttccttggaaatagaatttttca-3'
HELVL-F1	5'-ccaaatgttgcacatcgaggctcaccacca-3'
HELVL-R1	5'-ggggatcccttaatgtcgactcacacttatt-3'

[0053]

[表5]

PCRの反応組成

Reaction buffer(x10)		10μl
DNTP		8μl
Ex Taq		0.5μl
pAALFab(10ng/μl)		2μl
HELVH-F1又はHELVL-F1(20pmol/μl)		4μl
HELVB-R1又はHELVL-R1(20pmol/μl)		4μl
滅菌水		71.5μl
合計		100μl

[0054]

[表6]

PCRの反応条件

プレヒート	94°C × 5min	1cycle
変性	94°C × 0.5min	
アニーリング	60°C × 1min	30cycle
増幅	72°C × 1min	

[0055] [実施例5] マウス由来抗-卵白リゾチム(HEL)Fab遺伝子の発現系構築

Anti-HEL-Fab H鎖、及び、L鎖をコード

する遺伝子を含むそれぞれのpT7blueプラスミドDNAについて制限酵素処理を行い、Anti-HEL-Fab遺伝子断片の切り出しを行った。制限酵素はH鎖についてはNde I及びHind IIIの組み合わせを、L鎖についてはHind III及びBam HIをそれぞれ用いた。切断した遺伝子断片はそれぞれ2%アガロースゲルにより、分離・抽出した後、H鎖及びL鎖の順であらかじめ制限酵素(Nde I及びBam HI)処理したpET21aプラスミドDNA(Novagen)にライゲーションした。得られたライゲーション反応液をコンビテントセル大腸菌JM109株に加えることによりトランスフォーメーションした後、H鎖及びL鎖双方のAnti-HEL-Fab遺伝子を含む陽性コロニーからpET21aプラスミドDNAを回収した。

[0056] [実施例6] PPIase遺伝子とFab遺伝子の共発現

実施例3及び実施例5で得られたTcFK遺伝子を含むpACYC184プラスミド、及びAnti-HEL-

Fab遺伝子を含むpET21aプラスミドの共発現を試みた。両プラスミドをコンビテントセル大腸菌BL21(DE3)株に加えることによりトランسفォーメーションした後、100μg/mlアンビシリン及びクロラムフェニコールを含む寒天培地にて培養した。得られたコロニーを2×YT培地(Yeast Extract 16g L⁻¹, BACTOTRYPTON 20g L⁻¹, NaCl 5g L⁻¹, アンビシリン 100 μg ml⁻¹, クロラムフェニコール 100 μg ml⁻¹, pH 7.5) 700mlに接種した。35°Cで回転培養(110 rpm)した後、OD600が0.7となった時点での100mM IPTGを添加することにより、TcFK及びAnti-HEL-Fabの発現を誘導した。遠心分離(10000 rpm × 10 min)にて菌体を回収した。得られた菌体は1mM EDTAを含む25mM HEPES緩衝液(pH 6.8) 20 mlに懸濁し、-20°Cにて一晩凍結保存した。菌体を超音波破碎後、上清及び沈澱画分に分離し、それぞれをSDS-PAGEに供した(図2)。なお、図2-1中のレーン1はTcFK及びAnti-HEL-Fabを共発現させた大腸菌液、レーン2及び3は、それぞれ、その破碎液上清及び沈澱画分である。また、レーン4は、実施例4にて、大腸菌にTcFK遺伝子を組み込まず、クロラムフェニコールを除いた2×YT培地で培養した大腸菌の菌液である(比較例)。また、レーン5及び6は、それぞれ、その破碎液上清及び沈澱画分である。TcFKを発現させなかった場合、Anti-HEL-Fab遺伝子は不溶性画分に発現した(レーン6)。また、図2-2に示すように、発現したAnti-HEL-Fabを、anti-mouse IgG抗体を用いたウエスタンブロッティングにより確認した。上記のように、従来封入体としてしか発現しなかった抗体遺伝子を、TcFK遺伝子との共発現により、可溶画分に産生することが可能となった。

【0057】[実施例7] Fabの活性測定

得られたFabの活性は、HELを抗原とするELISA法において、1次抗体として機能するか否かで評価した。すなわち、96穴プレートに0.1mg/mlニワトリ卵白リゾチーム(HEL)溶液100μlを添加し、30°Cにて3時間インキュベーションすることにより、HELを固定化した。PBS緩衝液(pH 7.0)にてプレートを洗浄後、ブロックエース(大日本製薬)を含むPBS緩衝液でプロッキングした(4°C、オーバーナイト)。PBSにて洗浄後、実施例6のTcFKとの共発現の結果得られた可溶性Anti-HEL-Fab*

* bを含む大腸菌上清液及び10%ブロックエースを含むPBSを1次抗体液として用い、室温にて3時間インキュベートした。PBSにて洗浄後、2次抗体として0.1%Anti-mouse IgG-HRPコンジュゲート(フナコシ)を含むPBS緩衝液でインキュベート(2時間、30°C)した。PBSにて洗浄後、HRPの基質としてABTS液(フナコシ)100μlを加え、30分間インキュベートし、OD405を測定した。得られた結果を図3に示す。TcFKと共に発現させたAnti-HEL-Fabを含む大腸菌破碎液を1次抗体液として用いた場合、抗原に特異的に結合することが明らかである(■)。TcFKと共に発現させたAnti-HEL-Fabを含む大腸菌破碎液の代わりに、共発現させなかった大腸菌破碎液を用いた場合と比べ(□)、有意に一次抗体として機能していることが明らかである。

【0058】[実施例8] 封入体のフォールディングと活性評価

実施例6で得られたAnti-HEL-Fabの封入体を精製し、6Mグアニジン塩酸を含むPBS緩衝液(pH 7.0)で1時間室温にてインキュベーションすることにより、封入体を可溶化させた。この変性Anti-HEL-Fab1に対し、20倍量のTcFKを含む25mMリン酸ナトリウム(pH 7.0)で40倍に希釈することにより、Anti-HEL-Fabのフォールディングを開始させた。反応は30°Cで90分間行った。得られた反応溶液を実施例7に記載した方法により、フォールディングしたAnti-HEL-Fabが一次抗体として機能するか否かを検討した。実施例7で用いた大腸菌破碎液の代わりに、上記反応溶液を用いてELISAにて評価した。結果を図4に示す。TcFKと反応させたAnti-HEL-Fabは(■)、作用させなかったものと比べ(□)、有意に一次抗体として機能していることが明らかである。これらは抗原がない場合、全く反応せず、高い特異性を示した。

【0059】

【発明の効果】以上のことより、本発明によれば、実験動物を用いることなく、高効率に高特異性、高親和性のモノクローナル抗体を調製することができる。また、本発明によれば、抗体遺伝子と他のタンパク質やペプチド等をコードする遺伝子とを結合させることにより、多機能な抗体を調製することも可能となる。得られた抗体は、基礎研究分野だけでなく、診断分野、医療分野等の応用面においても極めて有用である。

【0060】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Sekisui Chemical Co.,Ltd
<110> Marine Biotechnology Institute
<130> 01P00164
<160> 6

17

18

<210> 1
<211> 157
<212> PRT
<213> Methanococcus jannaschii
<400> 1

Met Ile Asn Leu Ile Lys Lys Gly Asp Tyr Val Lys Val Asp Tyr Ile
1 5 10 15
Leu Glu Val Asp Gly Lys Val Ile Asp Thr Ser Ile Glu Glu Val Ala
20 25 30
Lys Glu Asn Lys Ile Tyr Tyr Pro Glu Arg Glu Tyr Glu Pro Ile Gly
35 40 45
Phe Ile Val Gly Asn Gly Glu Leu Ile Glu Gly Phe Glu Glu Ala Val
50 55 60
Ile Gly Met Glu Val Gly Glu Glu Lys Thr Val Thr Ile Pro Pro Glu
65 70 75 80
Lys Gly Tyr Gly Leu Arg Asp Glu Arg Leu Ile Gln Glu Ile Pro Lys
85 90 95
Glu Met Phe Ala Asp Ala Asp Phe Glu Pro Gln Glu Gly Met Leu Ile
100 105 110
Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Lys Ile Ile Lys Val Thr Asp Asp Thr
115 120 125
Val Thr Leu Asp Phe Asn His Glu Leu Ala Gly Lys Glu Leu Lys Phe
130 135 140
Thr Ile Lys Val Arg Asp Val Gln Pro Ala Glu Ser Glu
145 150 155

<210> 2

<211> 471

<212> DNA

<213> Methanococcus jannaschii

<400> 2

atg att aac ttg att aaa aaa ggt gac tat gtc aaa gta gat tat ata 48
tta gaa gta gat gga aaa gtt att qac aca tca att gaa gaa gta gct 96
aaa gaa aat aaa ata tac tat cct gaa aga gaa tat gag cca att gga 144
ttt att gta ggt aat gga gaa tta atc gaa ggt ttt gaa gaa gct qtt 192
ata ggc atq gaa gtt gga gaa gaa aaa act qta aca att cct cct gaa 240
aaa ggt tat gga ctt aga gat gag aga tta atc caa gaa ata cct aag 288
gaa atg ttt gct gat gct gac ttt gaa cca caq gag gga atq tta atc 336
tta gcc agt gga att cct qca aag ata ata aaa gtt act gat gat act 384
gta act tta gac ttt aac cac gag ctt gct gga aaa gaa tta aaa ttc 432
aca ata aaa gta aga gat gtc cag cca gct gag tca gaa taa 471

<210> 3

<211> 432

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 3

Met Gln Val Ser Val Glu Thr Thr Gln Gly Leu Gly Arg Arg Val Thr
1 5 10 15
Ile Thr Ile Ala Ala Asp Ser Ile Glu Thr Ala Val Lys Ser Glu Leu

19			
20	25	30	
Val Asn Val Ala Lys Lys Val Arg Ile Asp Gly Phe Arg Lys Gly Lys			
35	40	45	
Val Pro Met Asn Ile Val Ala Gln Arg Tyr Gly Ala Ser Val Arg Gln			
50	55	60	
Asp Val Leu Gly Asp Leu Met Ser Arg Asn Phe Ile Asp Ala Ile Ile			
65	70	75	80
Lys Glu Lys Ile Asn Pro Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Val Pro Gly Glu			
85	90	95	
Tyr Lys Leu Gly Glu Asp Phe Thr Tyr Ser Val Glu Phe Glu Val Tyr			
100	105	110	
Pro Glu Val Glu Leu Gln Gly Leu Glu Ala Ile Glu Val Glu Lys Pro			
115	120	125	
Ile Val Glu Val Thr Asp Ala Asp Val Asp Gly Met Leu Asp Thr Leu			
130	135	140	
Arg Lys Gln Gln Ala Thr Trp Lys Glu Lys Asp Gly Ala Val Glu Ala			
145	150	155	160
Glu Asp Arg Val Thr Ile Asp Phe Thr Gly Ser Val Asp Gly Glu Glu			
165	170	175	
Phe Glu Gly Gly Lys Ala Ser Asp Phe Val Leu Ala Met Gly Gln Gly			
180	185	190	
Arg Met Ile Pro Gly Phe Glu Asp Gly Ile Lys Gly His Lys Ala Gly			
195	200	205	
Glu Glu Phe Thr Ile Asp Val Thr Phe Pro Glu Glu Tyr His Ala Glu			
210	215	220	
Asn Leu Lys Gly Lys Ala Ala Lys Phe Ala Ile Asn Leu Lys Lys Val			
225	230	235	240
Glu Glu Arg Glu Leu Pro Glu Leu Thr Ala Glu Phe Ile Lys Arg Phe			
245	250	255	
Gly Val Glu Asp Gly Ser Val Glu Gly Leu Arg Ala Glu Val Arg Lys			
260	265	270	
Asn Met Glu Arg Glu Leu Lys Ser Ala Ile Arg Asn Arg Val Lys Ser			
275	280	285	
Gln Ala Ile Glu Gly Leu Val Lys Ala Asn Asp Ile Asp Val Pro Ala			
290	295	300	
Ala Leu Ile Asp Ser Glu Ile Asp Val Leu Arg Arg Gln Ala Ala Gln			
305	310	315	320
Arg Phe Gly Gly Asn Glu Lys Gln Ala Leu Glu Leu Pro Arg Glu Leu			
325	330	335	
Phe Glu Glu Gln Ala Lys Arg Arg Val Val Val Gly Leu Leu Leu Gly			
340	345	350	
Glu Val Ile Arg Thr Asn Glu Leu Lys Ala Asp Glu Glu Arg Val Lys			
355	360	365	
Gly Leu Ile Glu Glu Met Ala Ser Ala Tyr Glu Asp Pro Lys Glu Val			
370	375	380	
Ile Glu Phe Tyr Ser Lys Asn Lys Glu Leu Met Asp Asn Met Arg Asn			
385	390	395	400
Val Ala Leu Glu Glu Gln Ala Val Glu Ala Val Leu Ala Lys Ala Lys			
405	410	415	
Val Thr Glu Lys Glu Thr Thr Phe Asn Glu Leu Met Asn Gln Gln Ala			

(12)

特開2002-262883

21

420

425

22

430

<210> 4

<211> 1296

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 4

<210> 5

<211> 459

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Thr Ala Glu Glu Met Lys Ala Thr Glu Ser Gly Ala Gln Ser Ala

1 5 10 15

Glu Gly Val Asp Ile Ser

15

20 25 30

Lys Val Ile Lys Arg Glu Gly Thr Gly Thr Glu

40 45

Ile Gly Asp Arg Val Phe Val His Tyr Thr Gly Trp Leu Leu Asp Gly

50 55 60

Thr Lys Phe Asp Ser Ser Leu Asp Arg Lys Asp Lys Phe Ser Phe Asp

65 70 75 80

23

24

Leu Gly Lys Gly Glu Val Ile Lys Ala Trp Asp Ile Ala Ile Ala Thr
 85 90 95
 Met Lys Val Gly Glu Val Cys His Ile Thr Cys Lys Pro Glu Tyr Ala
 100 105 110
 Tyr Gly Ser Ala Gly Ser Pro Pro Lys Ile Pro Pro Asn Ala Thr Leu
 115 120 125
 Val Phe Glu Val Glu Leu Phe Glu Phe Lys Gly Glu Asp Leu Thr Glu
 130 135 140
 Glu Glu Asp Gly Gly Ile Ile Arg Arg Ile Gln Thr Arg Gly Glu Gly
 145 150 155 160
 Tyr Ala Lys Pro Asn Glu Gly Ala Ile Val Glu Val Ala Leu Glu Gly
 165 170 175
 Tyr Tyr Lys Asp Lys Leu Phe Asp Gln Arg Glu Leu Arg Phe Glu Ile
 180 185 190
 Gly Glu Gly Glu Asn Leu Asp Leu Pro Tyr Gly Leu Glu Arg Ala Ile
 195 200 205
 Gln Arg Met Glu Lys Gly Glu His Ser Ile Val Tyr Leu Lys Pro Ser
 210 215 220
 Tyr Ala Phe Gly Ser Val Gly Lys Glu Lys Phe Gln Ile Pro Pro Asn
 225 230 235 240
 Ala Glu Leu Lys Tyr Glu Leu His Leu Lys Ser Phe Glu Lys Ala Lys
 245 250 255
 Glu Ser Trp Glu Met Asn Ser Glu Glu Lys Leu Glu Gln Ser Thr Ile
 260 265 270
 Val Lys Glu Arg Gly Thr Val Tyr Phe Lys Glu Gly Lys Tyr Lys Gln
 275 280 285
 Ala Leu Leu Gln Tyr Lys Ile Val Ser Trp Leu Glu Tyr Glu Ser
 290 295 300
 Ser Phe Ser Asn Glu Glu Ala Gln Lys Ala Gln Ala Leu Arg Leu Ala
 305 310 315 320
 Ser His Leu Asn Leu Ala Met Cys His Leu Lys Leu Gln Ala Phe Ser
 325 330 335
 Ala Ala Ile Glu Ser Cys Asn Lys Ala Leu Glu Leu Asp Ser Asn Asn
 340 345 350
 Glu Lys Gly Leu Phe Arg Arg Gly Glu Ala His Leu Ala Val Asn Asp
 355 360 365
 Phe Glu Leu Ala Arg Ala Asp Phe Gln Lys Val Leu Gln Leu Tyr Pro
 370 375 380
 Asn Asn Lys Ala Ala Lys Thr Gln Leu Ala Val Cys Gln Gln Arg Ile
 385 390 395 400
 Arg Arg Gln Leu Ala Arg Glu Lys Lys Leu Tyr Ala Asn Met Phe Glu
 405 410 415
 Arg Leu Ala Glu Glu Glu Asn Lys Ala Lys Ala Glu Ala Ser Ser Gly
 420 425 430
 Asp His Pro Thr Asp Thr Glu Met Lys Glu Glu Gln Lys Ser Asn Thr
 435 440 445
 Ala Gly Ser Gln Ser Gln Val Glu Thr Glu Ala
 450 455

25

26

<211> 1377

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

atq aca gcc qaq qaq atq aag qcq acc	gqa gqc qgg qcq caq tcq qcq	48
ccg ctg ccc atq gaq gga qtq qac atc	aqc ccc aaa caq gac gaa qgc	96
gtq ctg aag qtc atc aag aqa qaq qoc	aca qgt aca qaq atq ccc atq	144
att qgg qac cga qtc ttt qtq cac tac	act qgc tqg cta tta qat qgc	192
aca aag ttt gac tcc agt ctg qat cgc	aag qac aaa ttc tcc ttt gac	240
ctq gga aaa qgg qag qtc atc aag qct	tqq gac att qcc ata qcc acc	288
atg aag qtq ggg qag qtq tgc cac atc	acc tgc aaa cca gaa tat qcc	336
tac qgt tca qca qgc agt cct cca aag	att ccc ccc aat qcc acq ctt	384
qta ttt gag qtq qag ttq ttt qag	ttt aag gga gaa qat ctq acq qaa	432
gag gaa qat qgc gga atc att cgc aqa	ata caq act cgc qgt gaa qgc	480
tat qct aag ccc aat qaq qgt qct atc	qtq qag gtt qca ctq gaa qgg	528
tac tac aag qac aag ctc ttt qac	caq cqg qag ctc cgc ttt qag att	576
ggc gag qgg qag aac ctq qat ctq	cct tat qgt ctq qag agg qcc att	624
caq cgc atq qag aaa qga gaa cat	tcc atc qtq tac ctc aag ccc aqc	672
tat qct ttt ggc agt gtt qgg aag	caa aag ttc caa atc cca cca aat	720
qct qag ctq aaa tat gaa tta cac	ctc aag agt ttt qaa aag qcc aag	768
qag tct tqq qag atq aat tca qaa qag	aaa ctq qaa caq aqc acc ata	816
gtq aaa qag cqg qgc act gtq tac	ttc aag gaa qgt aaa tac aag caa	864
qct tta cta caq tat aag aag atc	qtq tct tqq ctq gaa tat qag tct	912
agt ttt tcc aat qag gaa qca caq	aaa qca caq qcc ctt cqa ctq qcc	960
tct cac ctc aac ctg gcc atq tgt	cat ctg aaa cta caq gcc ttc tct	1008
qct gcc att gaa agc tgt aac aag	qcc cta gaa ctg qac agc aac aac	1056
qag aag qgc ctc ttc cgc cqg	qga qag qcc cac ctg qcc gtq aat qac	1104
ttt qaa ctg qca cqg gct	aat ttc caq aag qtc ctg caq ctc tac	1152
aac aac aaa qcc gcc aag acc	cc ctc gct gtq tgc caq cqg atc	1200
cga agg caq ctt gcc cqg	qag aag aag ctc tat qcc aat atq	1248
agg ctg qct qag qag	ttt qag aac aag qcc aag gca gag	1296
gac cat ccc act gac aca qag	qgt tcc tca qga qag qct aac acg	1344
qca qgg agc caq tct caq	qtg qag aca qaa qca tag	1377

【図面の簡単な説明】

[図1] サーモヨックカスsp. KS=1由来FKBPタ

イブPPIaseのシャベロン様活性を示す図である。

【図2】古細菌由来FKBP型PPIaseとマウス由

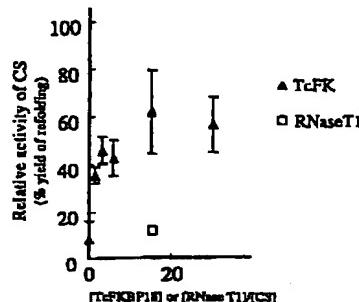
来Ant-i-HEL-Fabの共発現を示す図である。

【図3】共発現で得られたAnti-HEL-Fabの活性を示す図である。

【図4】封入体をリフォールディングして得られたA n t i - H E L - F a b の活性を示す図である。

【図1】

図1-1 TcFKのシャペロン様活性(50°C)



【図2】

図2-1 クーマシープリリアントブルーによる染色

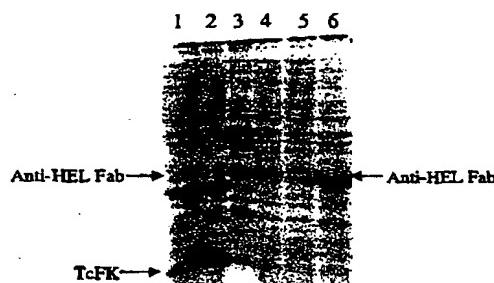
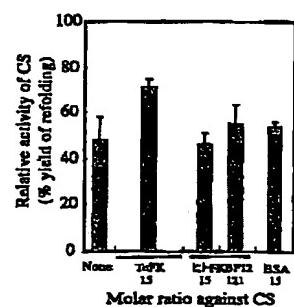


図1-2 TcFKのシャペロン様活性(30°C)



【図3】

図3 共発現の結果得られた組み換え型HEL-Fabの活性評価

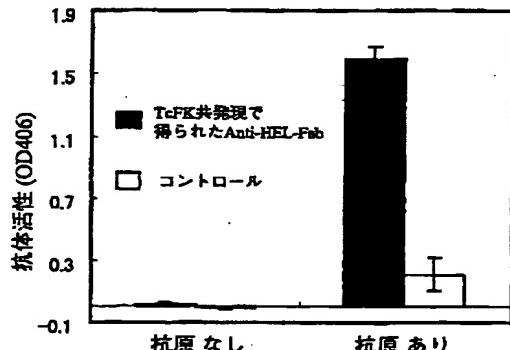
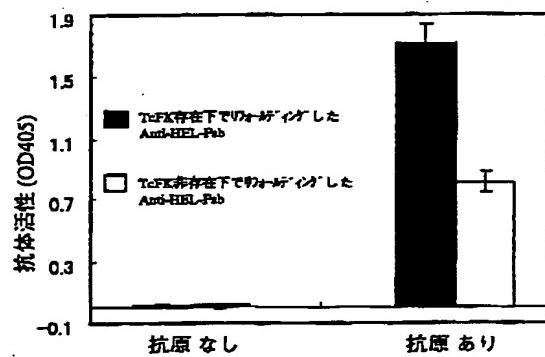


図2-2 抗マウスIgG抗体(ヤギ)による染色



【図4】

図4 インクルージョンボディーをリフォールディングして得られたAnti-HEL-Fabの活性



フロントページの続き

(S1) Int.C1.
C 1 2 N 5/10
C 1 2 P 21/08
// C 1 2 N 9/90

識別記号

F 1
C 1 2 N 9/90
(C 1 2 P 21/08
C 1 2 R 1:01)

マーク (参考)

(C 12 P 21/08
C 12 R 1:01)

C 12 N 15/00
5/00

Z N A A
A

(72)発明者 丸山 正
岩手県釜石市平田第3地割75番1 株式会
社バイオテクノロジー研究所釜石研究所内
(72)発明者 古谷 昌弘
大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学
工業株式会社内

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA20 BA07 BA43
CA04 DA06 EA04 GA11 HA01
4B050 CC07 DD02 EE10 LL05
4B064 AG27 CA02 CA19 CC24 DA01
DA13
4B065 AA01Y AA26X AA91Y AB01
AC14 BA02 BC50 CA25 CA44
CA46
4H045 AA20 BA10 CA11 CA42 DA76
DA89 EA20 EA50 FA67 FA74